

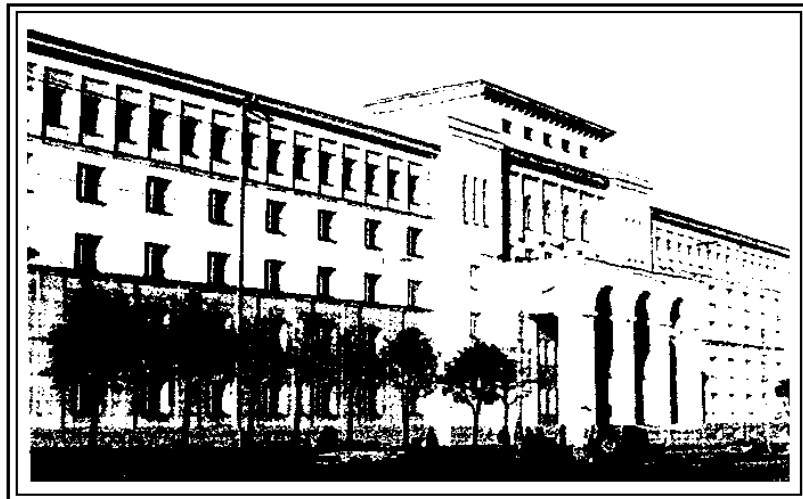
ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 19, №2

2020



МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 546.47.004.14:615.2

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

DOI: 10.37903/vsgma.2020:2.1

СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ СУБТОКСИЧЕСКОЙ ДОЗЫ ЦИНКА ДИАСПАРТАТА

© Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю., Дорошенко Е.М.

*Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80**Резюме*

Цель. Анализ изменения аминокислотного спектра плазмы крови крыс после однократного введения субтоксической дозы цинка диаспартата.

Методика. Эксперимент проводили на 29 крысах-самках массой 120-140 г. Животные были разделены на 2 группы: 1-й контрольной группе (n=8) – внутрижелудочно вводили физраствор (0,9% раствор натрия хлорида), 2-й группе животных (n=21) аналогичным образом вводили цинка диаспартат в дозе 500 мг/кг массы. Декапитацию животных осуществляли через 15, 30 и 90 мин. после введения цинка диаспартата. Для анализа использовали плазму крови, определение свободных аминокислот производили методом обращеннофазной ВЭЖХ.

Результаты. Однократное введение цинка диаспартата через 30 мин. снижало суммарное содержания свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов, протеиногенных заменимых и незаменимых аминокислот. Через 90 мин после однократного введения цинка диаспартата, следует отметить, снижение концентраций глюконогенных аминокислот (аспартат, серин, глицин, валин), что, вероятно, обусловлено опосредованными эффектами катионов цинка на энергетический обмен. Введение цинка диаспартата уменьшает содержание аминокислот с разветвленной углеродной цепью, что может указывать на анаболические эффекты цинка.

Заключение. Однократное внутрижелудочное введение цинка диаспартата в дозе 500 мг/кг быстро приводит к уменьшению общего количества свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в плазме крови крыс. Наиболее выраженные колебания концентраций свободных аминокислот наблюдаются через 30 мин. после введения цинка диаспартата. Снижение концентраций аминокислот и азотсодержащих метаболитов в плазме крови, вероятно, может указывать на их повышенный транспорт в ткани, либо свидетельствовать об их ретенции в клетках.

Ключевые слова: аминокислоты, цинка диаспартат, плазма крови

FREE AMINO ACIDS OF RAT BLOOD PLASMA AFTER SINGLE ADMINISTRATION SUB TOXIC DOSE OF ZINC ASPARTATE

Sheybak V.M., Pauliukavets A.Yu., Doroshenko E.M.

*Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic Belarus**Abstract*

Objective. To analyze the change in the spectrum of amino acid in blood plasma of rats after single administration sub toxic dose of zinc diaspartae.

Methods. The experiment was carried out on 29 female rats weighing 120-140 g. The animals were divided into 2 groups: 1st control group (n=8) – saline solution was administered intragastrically (0.9% sodium chloride solution), 2nd group of animals (n=21) zinc diaspartate was administered in a similar manner at a dose of 500 mg/kg of mass. The animals were decapitated 15, 30, and 90 minutes after the administration of the zinc diaspartate. Plasma was used for the analysis; the determination of free amino acids was carried out by the reverse phase HPLC method.

Results. A single administration of zinc diaspertate reduced the total content of free amino acids and their nitrogen-containing metabolites, proteinogenic, essential and non-essential amino acids after 30 minutes., it should be noted that the concentrations of glucogenic amino acids (aspartate, serine, glycine, and valine) decreased 90 minutes following a single injection of zinc diaspertate, which is probably due to the indirect effects of zinc cations on energy metabolism. The introduction of zinc diaspertate reduces the content of amino acids with a branched carbon chain, which may indicate anabolic effects of zinc.

Conclusions. A single intragastric administration of zinc diaspertate at a dose of 500 mg/kg quickly leads to a decrease in the total amount of free amino acids and their nitrogen-containing metabolites in rat blood plasma. The most pronounced fluctuations in the concentration of free amino acids are observed 30 minutes following the administration of zinc diaspertate. Reduced concentrations of amino acids and nitrogen-containing metabolites in the blood plasma may probably indicate their increased transport in the tissue or their retention in cells.

Keywords: amino acids, zinc diaspertate, blood plasma

Введение

Эффекты катионов цинка (биохимические и токсические) являются следствием биохимических превращений активных цинксодержащих соединений и результатом их участия в физиологических процессах [4]. Основное количество цинка в клетках находится в связанной с белками форме, которые выполняют различные функции, и только небольшая часть цинка находится в виде катиона Zn^{2+} [14]. Доказано, что даже при широком количественном диапазоне колебаний его поступления с пищей, общее содержание цинка в организме длительное время сохраняется стабильным. Абсорбция и эндогенная экскреция являются основными способами регуляции гомеостаза цинка. Тем не менее, компартиментализация этого микроэлемента нарушается при некоторых заболеваниях или физиологических дисфункциях. Динамический баланс между связанной и свободной (Zn^{2+}) формами цинка может быть нарушен в результате системного перераспределения и накопления его в определенных тканях [1].

В организме человека содержится примерно 2-3 г цинка: почти 90% в мышцах и костях, остальное количество распределяется между другими органами (простата, печень, желудочно-кишечный тракт, почки, кожа, легкие, мозг, сердце и поджелудочная железа) [7, 15]. На клеточном уровне 30-40% цинка локализуется в ядре, 50% – в цитозоле и оставшаяся часть связана с мембранами [9]. Клеточный гомеостаз цинка опосредуется семейства мибелков-транспортеров цинка (Zip, Zrt-, Irt-подобные белки, ZnT) [8].

При сканировании генома человека в отношении количества цинксодержащих структур, было выявлено, что по меньшей мере 3% генов кодируют цинксодержащие белки [9]. Общее число цинксодержащих протеинов более 3000. В настоящее время среди них идентифицировано 397 гидролаз; 302 лигаз; 167 трансфераз; 43 оксидоредуктаз; 24 лиаз/изомераз; 957 транскрипционных факторов; 221 сигнальных белка; 141 транспортер/запасающий белок; 53 протеина с металл-содержащими сайтами; 19 цинк-протеинов участвуют в репарации ДНК, репликации и трансляции; а также 883 цинксодержащих белка с неизвестными функциями [5]. Приблизительно в 70% цинксодержащих ферментов с катионом связана каталитическая функция. В других структурах цинк входит в состав белковых молекул, действует как субстрат или как регулятор ферментативной активности. Такое большое число цинк-зависимых ферментов объясняет незаменимость цинка для организма [12].

Цинк участвует в метаболизме аммиака – недостаточность этого микроэлемента снижает активность орнитинкарбамоилтрансферазы, а добавки цинка, напротив, восстанавливают функционирование цикла мочевины. Одновременно дефицит цинка снижает активность глутаминсинтетазы скелетных мышц, что способствует развитию гипераммониемии [2]. Очевидно, что недостаточная обеспеченность цинком существенно влияет на метаболизм аминокислот в организме, нарушая процессы межорганного транспорта аминокислот и иницируя гипераммониемию.

Вместе с тем, при однократном приеме чрезмерных количеств цинка наблюдаются токсические реакции [3], однако, не ясно насколько они обусловлены изменениями метаболизма свободных аминокислот и какова выраженность аминокислотного баланса в тканях при введении субтоксических количеств соединений цинка в организм.

Целью исследования явился анализ изменения аминокислотного спектра плазмы крови крыс после однократного введения субтоксической дозы цинка диаспартата.

Методика

Эксперимент проводили на 29 крысах-самках массой 120-140 г, при свободном доступе животных к пище и воде. Животные были разделены на 2 группы: 1-й контрольной группе (n=8) – внутрижелудочно вводили физраствор (0,9% раствор натрия хлорида), 2-й группе животных (n=21) аналогичным образом вводили цинка диаспартат в дозе 500 мг/кг массы (что в перерасчете на крысу в среднем в 3,5 раза превышает среднюю терапевтическую дозу для человека). Декапитацию животных осуществляли через 15, 30 и 90 мин. после введения цинка диаспартата. Для анализа использовали плазму крови. Определение свободных аминокислот производили методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Определение ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) проводили методом ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм – для триптофана). Все определения осуществляли с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработка данных – с помощью программы AgilentChemStation A10.01. Математическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Болюсное однократное внутрижелудочное введение цинка диаспартата через 15 мин. не изменяло общее содержание свободных аминокислот и суммарное количество их азотсодержащих производных. Однако, на этом фоне в плазме крови крыс уменьшалось общее количество аминокислот с разветвленной углеродной цепью (аминокислоты с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ), валин, лейцин, изолейцин) с 307 ± 21 нмоль/л до 227 ± 18 нмоль/л ($p < 0,05$) (табл. 1). Одновременно отмечено достоверное уменьшение концентраций отдельных незаменимых аминокислот: тирозина (на 26,5%), валина (на 28,5%), фенилаланина (на 22,7%) и лейцина (на 34,6%), а также азотсодержащих метаболитов аминокислот: α -аминомасляной кислоты (на 56,3%), β -аминомасляной кислоты (на 60%) и орнитина (на 24,9%) (табл. 1).

Таблица 1. Структура пула свободных аминокислот в плазме крови после введения цинка диаспартата в дозе 500 мг/кг (в динамике), нмоль/мл, $M \pm m$

Изучаемый показатель	Контроль	Цинка диаспартат 15 мин.	Цинка диаспартат 30 мин.	Цинка диаспартат 90 мин.
Общее количество свободных аминокислот и их азотсодержащих производных	3043±220	2771±215	2109±103*	2399±75*
Общее количество протеиногенных аминокислот	2722±194	2466±197	1840±88*	2130±70*
Общее количество заменимых аминокислот	1687±125	1635±108	1274±55*	1362±25*
Общее количество незаменимых аминокислот	1035±90	831±94	565±37*	769±51*
Общее количество аминокислот с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ)	307±21	227±18*	173±13*	226±7*
Общее количество ароматических аминокислот	170±13	143±9	125±9*	146±10
АРУЦ/ароматические аминокислоты	1,8±0,08	1,6±0,1	1,4±0,09*	1,6±0,12

Через 30 мин. после внутрижелудочного введения цинка диаспартата регистрировали снижение суммарного содержания свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов, протеиногенных заменимых и незаменимых аминокислот. На этом сроке эксперимента отмечено дальнейшее падение количества АРУЦ в плазме крови. Достоверно уменьшалось и суммарное содержание в плазме ароматических аминокислот (табл. 1). Вышеуказанные изменения были вызваны снижением концентраций заменимых аминокислот: аспарагина (на 41,1%), серина (на 36,8%), глутамина (на 26,5%), гистидина (на 40,2%), глицина (на 32%), аргинина (на 24,2%); незаменимых аминокислот: треонина (на 42,5%), тирозина (на 32,9%), валина (на 42,6%), метионина (на 28,4%), фенилаланина (на 37,5%), изолейцина (на 36,4%), лейцина (на 49,9%), а также лизина (на 59,0%); азотсодержащих метаболитов аминокислот: α -аминомасляной кислоты (на 58,3%), фосфоэтанолamina (на 66,7%), 1-метилгистидина (на 35,7%), α -аминомасляной кислоты (на 72%), β -аминомасляной кислоты (на 50%), орнитина (на 28%) (табл. 2).

Снижение концентрации орнитина через 15 и 30 мин. после введения цинка диаспартата, могло быть обусловлено влиянием катионов цинка на активность орнитинкарбамоилтрансферазы, фермента цикла мочевины, который катализирует перенос карбамоильной группы с

карбамоилфосфата на орнитин с образованием цитруллина [6]. Однако, введение цинка диаспартата не вызывало изменения концентрации цитруллина в плазме крови животных на данном сроке эксперимента.

Через 90 мин. после введения цинка диаспартата в плазме крови сохраняется уменьшение общего содержания аминокислот и их азотсодержащих производных (с 3043 ± 220 мкмоль/л до 2399 ± 75 мкмоль/л), протеиногенных аминокислот (обусловленное снижением суммарного количества как заменимых, так и незаменимых аминокислот), а также АРУЦ (табл. 1). Отдельно следует отметить снижение в плазме крови уровней аспартата (на 59%), серина (на 31,1%), гистидина (42,5%), глицина (25,4%), валина (на 28,3%), изолейцина (на 23%) и лейцина (на 26,4%), а также α -аминомасляной кислоты (на 66,7%) (табл. 2).

Таблица 2. Свободные аминокислоты в плазме крови после введения цинка диаспартата в дозе 500 мг/кг (в динамике), нмоль/мл, $M \pm m$

Аминокислота	Контроль	Цинка диаспартат 15 мин.	Цинка диаспартат 30 мин.	Цинка диаспартат 90 мин.
Аспартат	25,1 \pm 2,54	29,8 \pm 2,34	30,9 \pm 1,93	39,9 \pm 3,70*
Аспарагин	57,3 \pm 5,59	45,8 \pm 4,12	33,7 \pm 2,21*	45,7 \pm 1,81
Серин	179,2 \pm 14,55	155,6 \pm 13,28	113,2 \pm 7,49*	123,5 \pm 8,66*
Глутамин	508,4 \pm 44,00	472,0 \pm 47,97	373,6 \pm 16,08*	393,7 \pm 20,08
Гистидин	49,2 \pm 5,13	36,4 \pm 6,93	29,4 \pm 2,66*	28,3 \pm 1,72*
Глицин	175,0 \pm 13,20	183,7 \pm 10,86	119,0 \pm 13,25*	130,5 \pm 12,32*
Треонин	166,3 \pm 21,23	139,9 \pm 8,63	95,6 \pm 5,43*	123,0 \pm 11,69
Аргинин	106,2 \pm 9,72	102,5 \pm 5,64	80,5 \pm 2,37*	92,2 \pm 5,53
Тирозин	62,0 \pm 4,91	45,6 \pm 3,90*	41,6 \pm 3,0*	48,5 \pm 4,12
Валин	132,3 \pm 8,89	94,6 \pm 6,23*	76,0 \pm 5,40*	94,9 \pm 3,66*
Метионин	34,5 \pm 3,68	32,9 \pm 2,30	24,7 \pm 1,19*	32,7 \pm 1,63
Фенилаланин	47,2 \pm 4,07	35,6 \pm 2,62*	29,5 \pm 2,34*	37,4 \pm 2,61
Изолейцин	71,4 \pm 3,53	64,6 \pm 5,82	45,4 \pm 2,53*	55,0 \pm 1,05*
Лейцин	103,8 \pm 9,38	67,5 \pm 7,36*	52,0 \pm 5,43*	76,4 \pm 2,60*
Лизин	357,6 \pm 51,10	288,6 \pm 65,06	146,6 \pm 16,03*	240,7 \pm 40,17
α -Аминоадипиновая кислота	0,48 \pm 0,06	0,21 \pm 0,04*	0,2 \pm 0,05*	0,4 \pm 0,05
Фосфоэтаноламин	2,1 \pm 0,45	1,4 \pm 0,53	0,7 \pm 0,11*	1,2 \pm 0,21
1-Метилгистидин	2,8 \pm 0,33	2,6 \pm 0,27	1,8 \pm 0,15*	2,1 \pm 0,13
β -Аминомасляная кислота	1,0 \pm 0,16	0,4 \pm 0,07*	0,5 \pm 0,05*	0,7 \pm 0,09
α -Аминомасляная кислота	18,3 \pm 3,43	10,1 \pm 2,62	5,0 \pm 0,81*	6,1 \pm 0,61*
Орнитин	47,8 \pm 3,91	35,9 \pm 2,69*	34,4 \pm 1,81*	40,0 \pm 1,94

Формирование пула свободных аминокислот и их азотсодержащих производных плазмы крови крыс после однократного внутрижелудочного введения цинка диаспартата было проанализировано с использованием линейного дискриминантного анализа, позволяющего перейти к рассмотрению малого набора переменных (корней дискриминантных функций). Значение критерия Лямбда Уилкса и соответствующего ему критерия Фишера (0,0018650 и 4,785696 соответственно) доказывают высокую степень дискриминации групп. Наибольший вклад в дискриминацию функций (т.е. имеющие наибольшую вариабельность) вносят аспарагин ($F=8,908400$), β -аминомасляная кислота ($F=7,843785$) и глутамин ($F=5,802676$) (рис.). Анализируя значения квадратов расстояний Махаланобиса между центроидами групп и диаграмму рассеяния (см. рис.), можно заключить, что центростид группы «Цинк аспартат 90 мин» наиболее удален в пространстве дискриминантных функций от таковой контрольной группы (квадрат расстояния Махаланобиса = 91,5), квадраты расстояний Махаланобиса для групп «Цинк аспартат 15 мин.» и «Цинк аспартат 30 мин.» от контроля составляют 64,9 и 63,9 соответственно (рис.).

Следует отметить, снижение концентраций глюкогогенных аминокислот (аспартат, серин, глицин, валин), что, вероятно, обусловлено опосредованными эффектами катионов цинка на энергетический обмен. Показано, что введение соединений цинка оказывает влияние на уровень глюкозы в крови [10]. Введение цинка диаспартата уменьшает содержание аминокислот с

разветвленной углеродной цепью валин, изолейцин, лейцин в плазме крови, что может указывать на анаболические эффекты цинка [11]. Острый эффект цинка диаспартата на уровень гистидина предшественника гистамина, что может иметь отношение к известному механизму противовоспалительного действия катионов цинка [13].

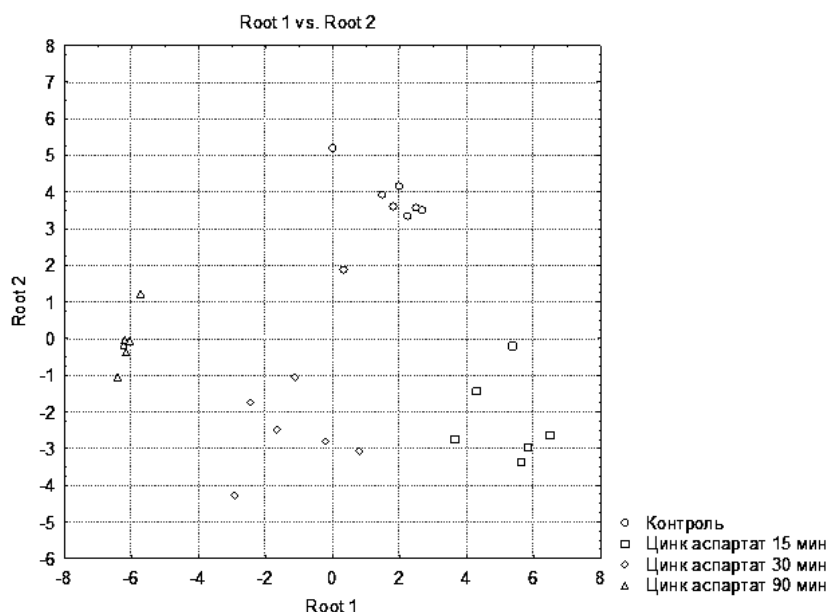


Рис. График проекции распределения фонда свободных аминокислот и их азотсодержащих производных плазмы крыс, получавших цинк аспартат (500 мг/кг внутрижелудочно)

Выводы

1. Однократное внутрижелудочное введение цинка диаспартата в дозе 500 мг/кг быстро приводит к уменьшению общего количества свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в плазме крови крыс, которое сохранялось и через 90 мин.
2. Наиболее выраженные колебания концентраций свободных аминокислот наблюдаются через 30 мин. после введения цинка диаспартата.
3. Снижение концентраций аминокислот и азотсодержащих метаболитов в плазме крови, вероятно, может указывать на их повышенный транспорт в ткани, либо свидетельствовать об их ретенции в клетках.

Литература (references)

1. Шейбак В.М., Шейбак Л.Н. Биологическая роль цинка и перспективы медицинского применения цинк-содержащих препаратов. – Гродно, 2003. – 82 с. [Shejbak V.M., Shejbak L.N. *Biologicheskaja rol' cinka i perspektivy medicinskogo primenenija cink-soderzhashhih preparatov*. Biological role of zinc and prospects of medical application of zinc-containing preparations. – Grodno, 2003. – 82 p. (in Russian)]
2. Шейбак В.М., Горецкая М.В., Павлюковец А.Ю. Биологическая роль цинка при алкогольном и вирусном поражении печени (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии. – 2013. – №2. – С. 14-20. [Shejbak V.M., Goreckaja M.V., Pavljukovec A.Ju. *Problemy zdorov'ja i jekologii*. Problems of health and ecology. – 2013. – N2. – P. 14-20. (in Russian)]
3. Шейбак В. М. Биологическое значение и регуляция гомеостаза цинка у млекопитающих // Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – №4. – С.11-16. [Shejbak, V. M. *Problemy zdorov'ja i jekologii*. Problems of health and ecology. – 2016. – N4. – P. 11-16. (in Russian)]
4. Aimo L., Cherr G. N., Oteiza P. I. Low extracellular zinc increases neuronal oxidant production through nadph oxidase and nitric oxide synthase activation // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2010. – V.48. – P. 1577-1587.
5. Andreini C., Banci L., Bertini I. et al. Zinc through the three domains of life // *Journal of Proteome Research*. – 2006. – V.5. – P.3173-3178.

6. Aquilio E., Spagnoli R., Riggio D. et al. Effects of zinc on hepatic ornithine transcarbamylase (OTC) activity // Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease: Analytical Methods, Metabolism. – 1993. – V.7. – P. 240-241.
7. Bentley P.J. Grubb B.R. Experimental dietary hyperzincemia tissue disposition of excess zinc in rabbits // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 1991. – V.8. – P. 202-207
8. Lichten L.A., Cousins, R.J. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation // Annual Review of Nutrition. – 2009. – V.29. – P. 153-176.
9. Maret W. Exploring the zinc proteome. // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2004. – V.19. – P. 15-19.
10. Miao X., Sun W., Fu Y. et al. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes // Frontiers of Medicine. – 2013. – V.7. – P. 31-52.
11. Ovesen J., Møller-Madsen B., Thomsen J.S. et al. The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats // Bone. – 2001. – V.29. – P. 565-570.
12. Sharif R., Thomas P., Zalewski P. et al. The role of zinc in genomic stability // Mutation Research. – 2012. – V.733. – P. 111–121.
13. Trethewie E.R. Inhibition of Histamine Response by Zinc // Pharmacology. – 1968. – V.1. – P. 195-198
14. Vallee, B.L. Falchuk K.H. The biochemical basis of zinc physiology // Physiological reviews. – 1993. – V.73. – P. 79-118.
15. Wastney M.E., Aamodt R.L., Rumble W.F. et al. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans // American Journal of Physiology. – 1986. – V.251. – P. 398-408.

Информация об авторах

Шейбак Владимир Михайлович – доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии Гродненского государственного медицинского университета. E-mail: vsheibak@gmail.com

Павлюковец Анастасия Юрьевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга Гродненского государственного медицинского университета. E-mail: anastasiayk@mail.ru

Дорошенко Евгений Михайлович – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории Гродненского государственного медицинского университета. E-mail: dgi03@mail.ru